CUANTIFICACIÓN DE PROGENITORES CD34

Bioquímica Fanessi Viviana

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

ALTA COMPLEJIDAD EN RED
Hospital El Cruce

Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)

- Los primeros trasplantes se realizaron en gemelos idénticos, el advenimiento de nuevas técnicas que permitieron conocer el CMH, se amplió el espectro de trasplantes a donantes relacionados y no relacionados.
- La efectividad del tratamiento se ve reflejada en el crecimiento constante del número de TCPH realizados en todo el mundo.
- Es usado como tratamiento para fallos medulares, errores innatos del metabolismo, deficiencias inmunes, enfermedades malignas hematológicas y hasta en tumores sólidos.

Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH)- continuación

- Las mejoras en los regímenes de acondicionamiento, la introducción de esquemas no mieloablativos, nuevas técnicas diagnósticas y tratamientos antimicrobianos, han bajado la tasa de recaídas, prolongando la edad para acceder al trasplante, disminuido las complicaciones infecciosas y reducido la mortalidad.
- Los avances en inmunología del trasplante han mejorado el conocimiento y el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped.

Indicaciones de trasplantes de células hematopoyéticas

1. **Falta de células madre**
   Aplasia medular, anemia de Fanconi
2. **Falta de producción de alguna línea celular**
   Eritroblastopenias, neutropenias y trombocitopenias congénitas o adquiridas
3. **Transformación neoplásica de alguna de ellas**
   Leucemias agudas y crónicas, linfomas y otros síndromes linfoproliferativos,mieloma y otras enfermedades de las células plasmáticas, síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos
4. **Producción de células malfuncionantes**
   Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, alteraciones congénitas de los granulocitos, enfermedades metabólicas de depósito

¿Qué es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas ?

- Procedimiento en el que las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) son infundidas para restaurar la función de la médula ósea (MO)

Objetivos del trasplante

- Permitir la administración de un tratamiento antineoplásico intenso con dosis elevadas de quimioterapia o radioterapia
- Sustituir la hematopoyesis del paciente

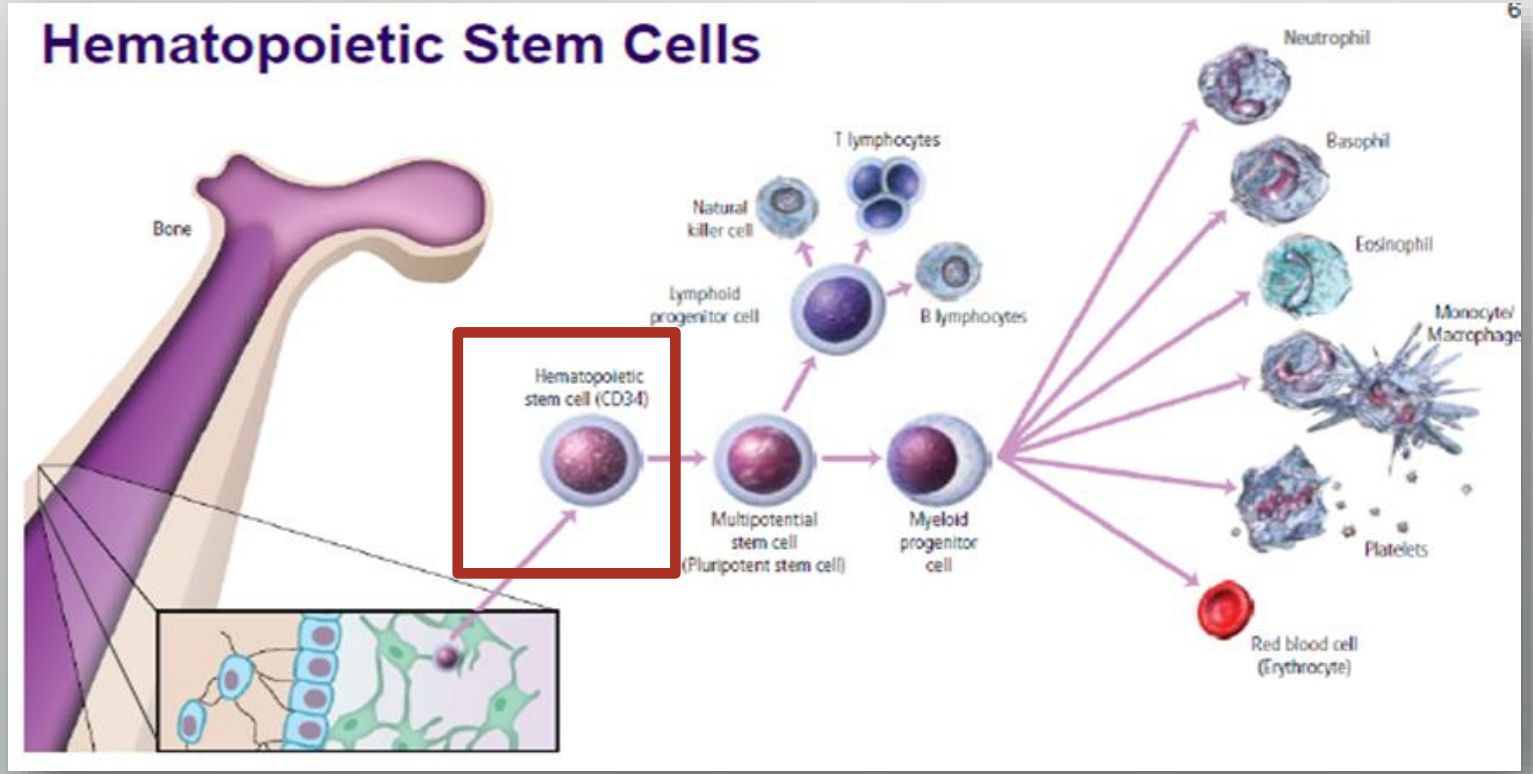
Tipos de trasplantes de CPH

SEGÚN EL TIPO DE DONANTE	
AUTOLOGO	Los CPH son del propio paciente obtenidos antes de administrar las altas dosis de quimio/radioterapia.
SINGENICO	Realizado con hermanos gemelos univitelinos (HLA idéntico)
ALOGENICO	Distinto a un gemelo univitelino A) Donante relacionado histoidentico. B) Donante relacionado haploidéntico, comparte al menos un haplotipo. C) Donante no relacionado, obtenidos a partir de los distintos registros internacionales.

Tipos de trasplantes de CPH

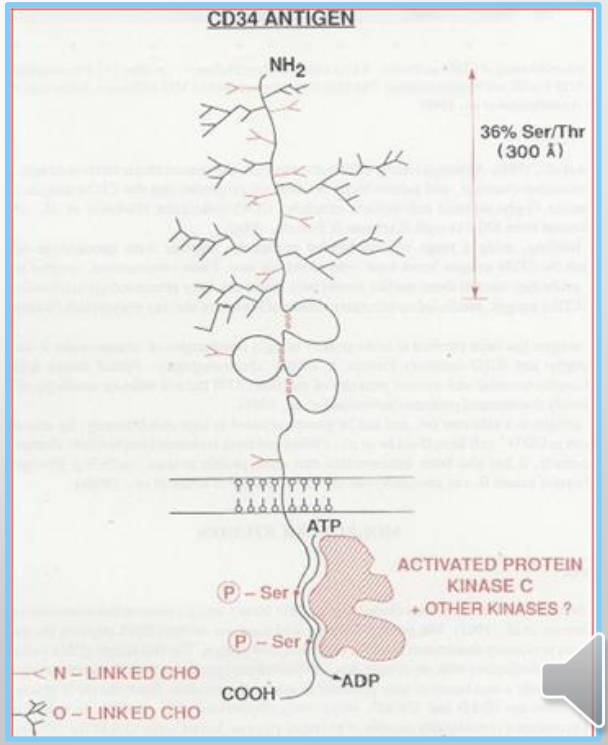
SEGUN LA FUENTE DE CPH
Médula Ósea
Sangre periférica
Cordón umbilical

Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)



Molécula de CD34

- Proteína glicosilada tras-membrana PM: 105-120KD, rol protector contra daño proteolítico , por su gran n° de sitios glicosilados.
- Es una proteína de adhesión, media la unión de Stem Cells a la matriz extracelular o células estromales de la médula ósea.



Molécula de CD34

3 Epitopes: sensibles a neuraminidasas y glicoproetasas

- Clase I : Epitopes sensibles a neuraminidasa y glicoproteasa
- Clase II: Epitopes sensibles a glicoproteasa
- **Clase III: Epitopes insensibles a ambas enzimas**

- CPH es una población heterogénea que incluye a las stem cell pluripotentes así como a los precursores diferenciados a linaje.

- CPH expresan el antígeno CD34 Marcador confiable para reconocer células mononucleares de MO (1%) que incluyen a las HPC.
- CPH expresan: CD34+ / CD45dim / SSC bajo / FSC bajo a intermedio.

Por qué realizar recuento de CD34?

- Evaluar la viabilidad de médula ósea y la sangre del cordón umbilical.
- Monitoreo de CD34+ en SP permite establecer el momento óptimo de recolección por leucoaféresis.
- N° de células CD34+ infundidas es predictivo de mejor sobrevida del paciente post-trasplante no relacionado.
- La eficiencia de un injerto de célula madre hematopoyética, depende principalmente del número de CD34+ viables presentes.
- Asociación con el desarrollo de Síndrome de Injerto contra huésped (EICH) cuando se usa sangre periférica.

Fundamentos Método ISHAGE

International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE)

- **Control de isotipo:** puede enmascarar CD34 auténticos
  No se recomienda para establecer región de positividad
  Se recomienda CD45 FITC/ Isotipo PE

- **Anticuerpos Anti CD34**
  Selección del clon adecuado
  Selección de Fluorocromos

- **Anticuerpos Anti CD45**
  Antígeno CD45 pan leucocitario
  Negativo en glóbulos rojos y plaquetas

Recuento CD34- Generalidades

- Se recomienda un recuento de al menos 50.000 células y el empleo de anticuerpos monoclonales **anti-CD34 de clase III** conjugados con ficoeritrina (PE)
- Debe hacerse recuento únicamente de las células que expresan CD34 de alta intensidad.
- Se utiliza una doble marcación de CD34 y CD45 con esto se obtiene el porcentaje de CPH.
- Para obtener la concentración total se cuantifican los leucocitos en un analizador hematológico (método de dos plataformas)
- También se puede realizar adicionando un número conocido de perlas fluorescentes lo que permite calcular el volumen de sangre analizado (plataforma única).

Metodología Recuento de CD34

- **DOBLE PLATAFORMA**

- Mediciones simultáneas (citometro +contador hematológico)

- Muestras sin lavados

-Todos los equipos controlados

- **SIMPLE PLATAFORMA**

  - BD™ Trucount beads

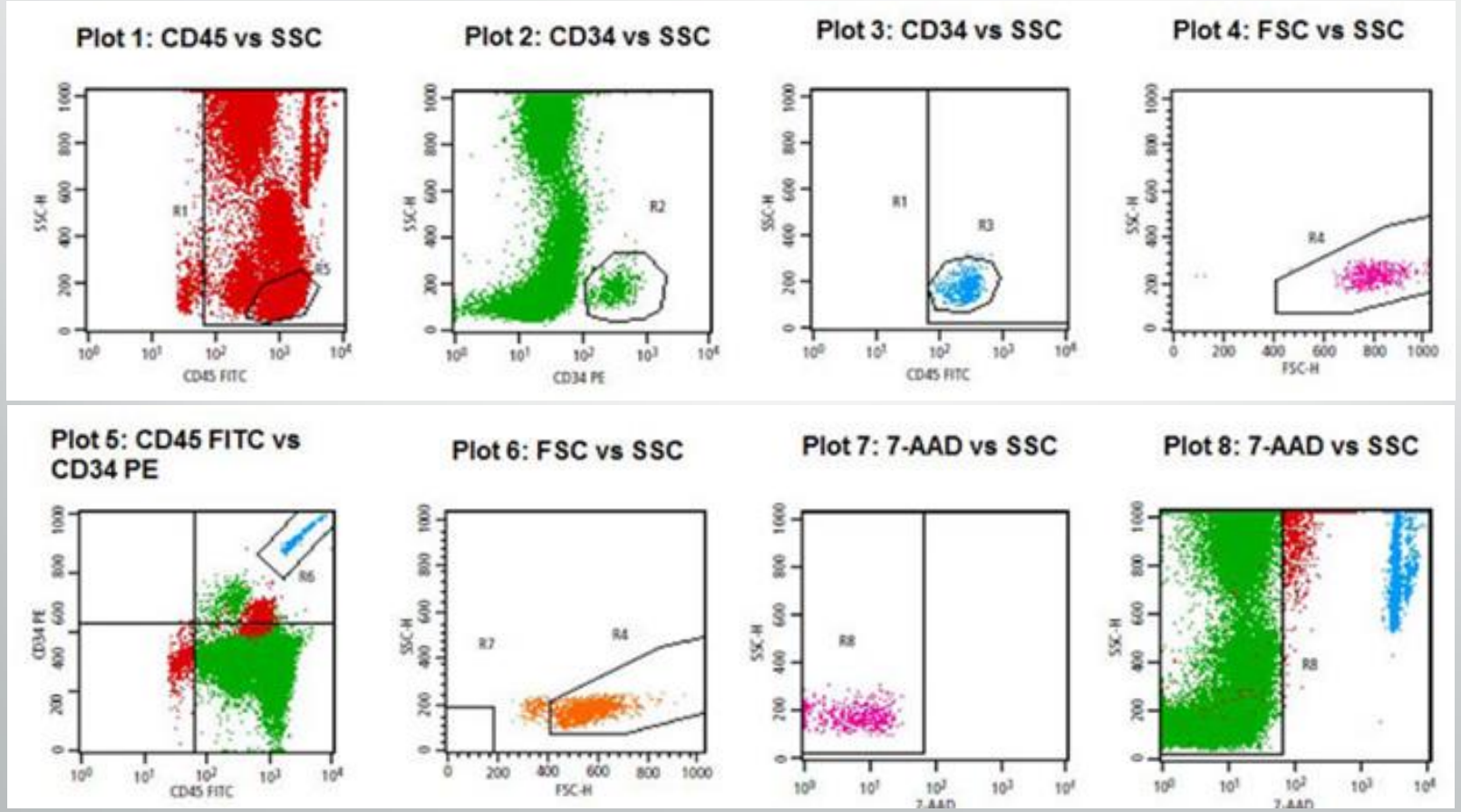
  - Stem Cell Enumeration Kit

Protocolo ISHAGE modificado con 7 AAD y beads

Actualmente:

- Plataforma única
- Marcaje, lisados, sin lavado.
- Tinte de vitalidad incorporado: 7AAD (7 actinomicina D)
- Kits disponibles comercialmente: BD trucount, Kit de células madre (BD), Stem-kit (Beckman Coulter)
- Beads: conteos absolutos

Estrategia de análisis ISAGHE modificado



Estrategia de análisis

4 Pasos secuenciales de gating:

– Gate en los leucocitos (CD45 débil a CD45++) .

– Gate en los CD34+.

– Gate en el cluster de células : **CD45 dim**, baja **SSC** y **CD34+:** selecionar HPC

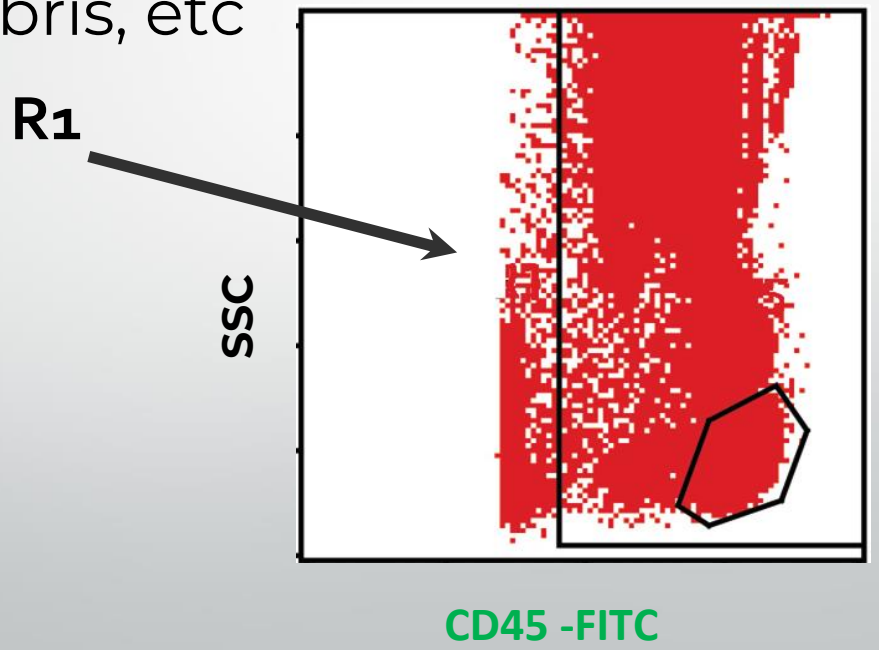
– Excluir eventos como células apoptóticas, acúmulos de plaquetas .

• Protocolo original – control de isotipo , murine IgG1.

• Fue omitido en las otras plataformas.

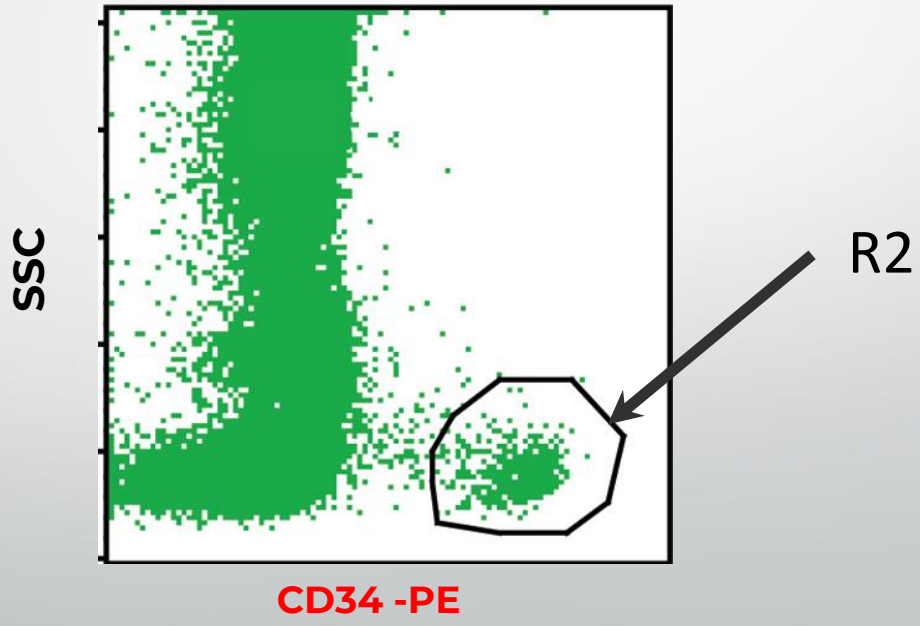
Estrategia de análisis

Gate primario en CD45 vs SSC : excluir plaquetas, glóbulos rojos, debris, etc



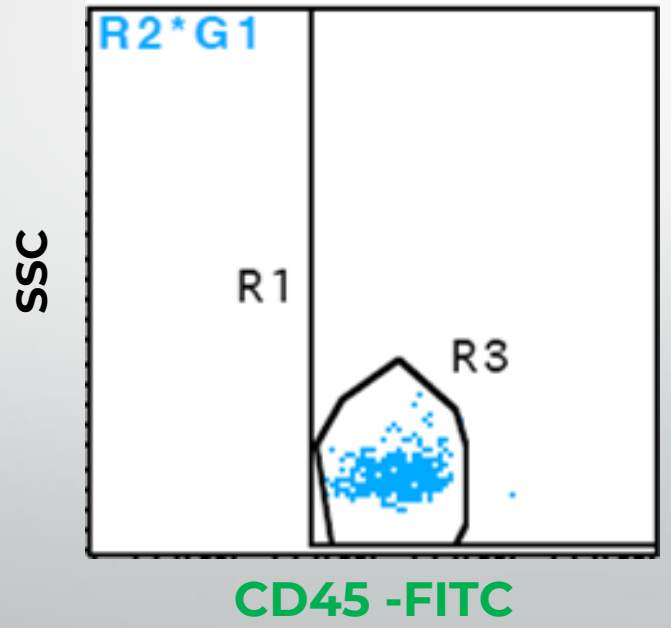
Estrategia de análisis

Gate secundario en CD34 vs SSC de las CD45+



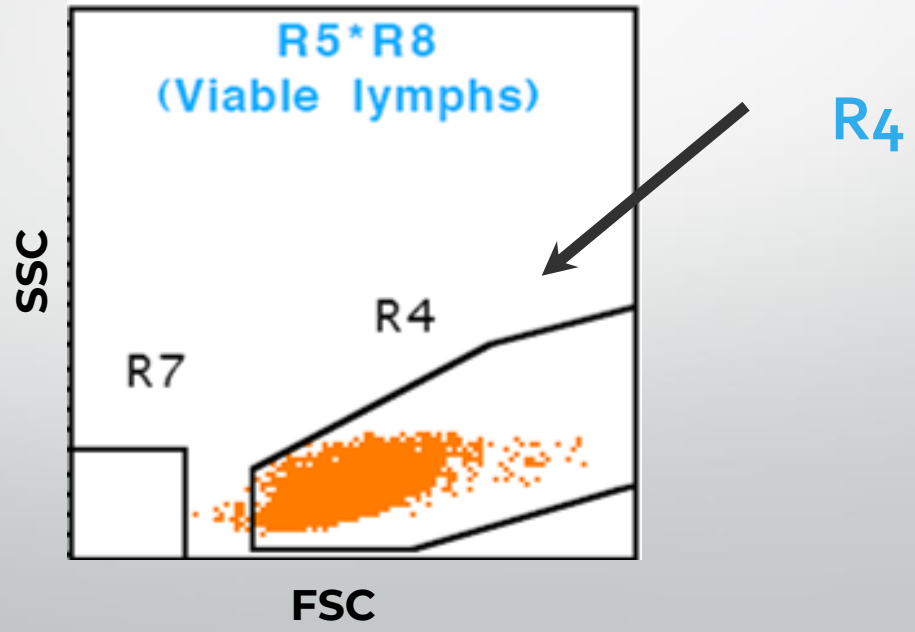
Estrategia de análisis

CD45 vs SSC de las CD34+



Estrategia de análisis

FSC vs SSC de las CD34+



Cuantificación de CD34 por Citometría de Flujo

- Simple
- Rápido
- Reproducible
- Exacto
- Sensible

Metodología Simple Plataforma

- Cumple con las pautas de ISHAGE
- Ensayo de tubo único
- Compatible con varios tipos de muestra y anticoagulantes
- Mayor estandarización inter-laboratorio
- Se evitan errores inherentes al uso de un 2° equipo
- Exactitud y reproducibilidad del pipeteo
- Errores de 0.06% a 0.1%
- N° de eventos analizados = 75.000 eventos CD45+
- Mínimo 100 células CD34+

Preparación muestras y QC CD34 Kit

1

20 ul de CD45/CD34PE

+

20ul de 7AAD

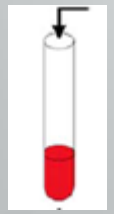
+

100ul de muestra por pipeteo reverso

Tubos Trucount

Vortex e incubación en oscuridad a TA por 20 min

Diluir muestras cuando > 40,000 cel/ µL con PBS BSA



Adicionar 2 ml de solución 1X ClHN4

Adquisición

2

3

Preparación optimización CD34 Kit

1

20 ul de CD45/CD34PE

+

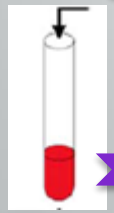
20ul de 7AAD

+

100ul de muestra por pipeteo reverso

Tubos poliestireno

Vortex e incubación en oscuridad a TA por 20 min



Adicionar 2 ml de solución 1X ClHN4

Adquisición Optimización

2

3

Diluir muestras cuando > 40,000 cel/ µL con PBS BSA

Organigrama de trabajo

Realizar el arranque del Citómetro y lavados iniciales
Ingresar los ID de los lotes de reactivos (tubos Trucount y Kit) y los valores target
Valores mínimos de adquisición CD45 viables: 75.000 eventos
CD34 viables min: 100 eventos
Máximo tiempo de adquisición: 900 segundos

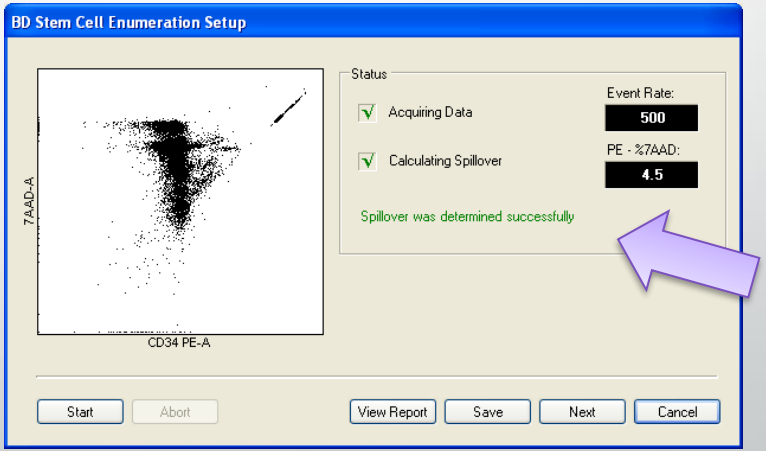
Organigrama de trabajo

Seguir la configuración a lo largo del tiempo para medir rendimiento y estabilidad.
Perform QC con 7-Color Setup Beads

Organigrama de trabajo

Encendido sistema → QC → Optimización seteo → Adquisición datos → Análisis de datos → **Informe** → Apagado del sistema

Optimizar configuraciones para el panel de Stem Cells



Organigrama de trabajo

Adquirir los QC del proceso (bajo y alto). OK
Adquirir las muestras de los pacientes

Organigrama de trabajo

Kit Stem Cells
Recuento
Trucount

Simple Plataforma

Análisis y resultados CD34

CD34+ Viable Abs Cnt (cells/µl)	3975.94
CD45+ Viable Abs Cnt (cells/µl)	373301.10
CD34+ Viable Events	992
CD45+ Viable Events	93139
Bead Events	1000
Viable CD34+ % Viable CD45+	1.07
CD34 Viability (%)	99.40
Viable CD34+ CV (%)	3.18

Mensajes de Control de Calidad

Ventana manual activa.
Inspeccionar todos los gráficos de puntos.

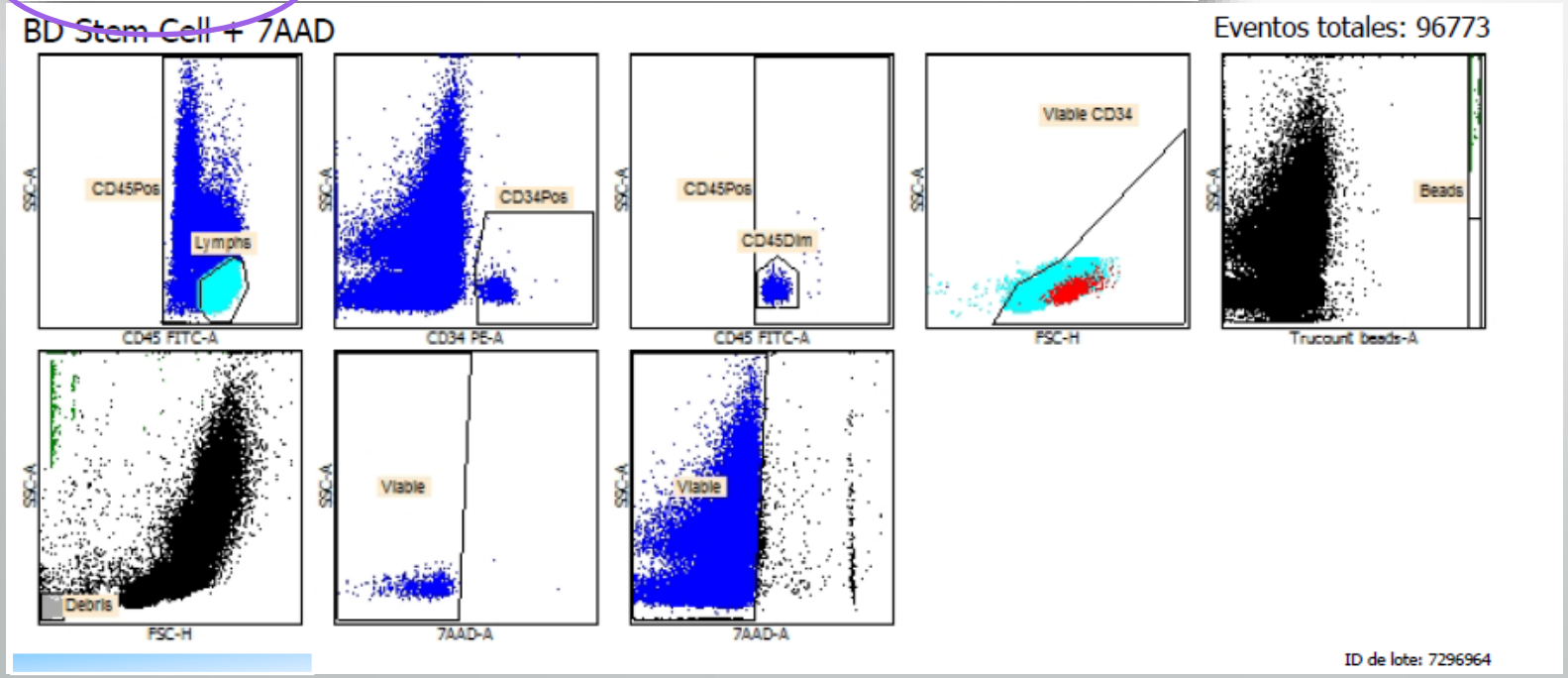
Comentarios

Reporte

Director:	Panel:	BD Stem Cell + 7AAD
	Adquirido:	8/28/2018 11:32:19 AM
	Analizado:	8/28/2018 11:32:55 AM
	ID de lote TruC:	17173
	M/S (microesferas/sedimento):	50100
	Estado:	OK
	Operador:	Htal El Cruce
	Revisor:	
	Resultados:	28082018.csv

Dilution Factor: 8.0 Column #2: Column #3:

BD FACSCanto II V33896002106 BD FACSCanto v.3.0.4894.41215



Puntos Críticos

- Plataformas de CF, calibración y optimización
- Anticuerpos anti CD34 : Epitope y Clon
- Fluorocromos
- Selección de células nucleadas : CD45
- Exclusión de células muertas
- Lisis de glóbulos rojos
- Recuento de leucocitos

Recuento CPH

Estandarización de los procesos en el laboratorio de Citometría de flujo

Calidad y confiabilidad en los resultados de los pacientes

Informes

MUCHAS GRACIAS

vjfanessi@gmail.com